

Aus der Universitäts-Kinderklinik Marburg an der Lahn
(Direktor: Prof. Dr. med. F. Linneweh)

**Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen
in Leukocyten im in-vitro-Versuch
Abhängigkeit der Ingestion von Latexpartikeln
und Vakuolenentstehung von Entzündungs-
prozessen und Dimethylsulfoxid**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Gerhard Seebach

aus Diez/Lahn

Marburg

1972

Druck: Buch- und Offsetdruckerei H. Kombächer, Marburg

Angenommen von dem Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 11. Juli 1972
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen

Referent: Prof. Dr. med. F. Linneweh

Correferent: Prof. Dr. med. W. Thoenes



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Universitäts-Kinderklinik Marburg an der Lahn
(Direktor: Prof. Dr. med. F. Linneweh)

**Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen
in Leukocyten im in-vitro-Versuch
Abhängigkeit der Ingestion von Latexpartikeln
und Vakuolenentstehung von Entzündungs-
prozessen und Dimethylsulfoxid**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Gerhard Seebach

aus Diez/Lahn

Marburg

1972

Druck: Buch- und Offsetdruckerei H. Kombächer, Marburg



GLIEDERUNG

- A. Einleitung
- B. Methodische Angaben
 - 1. Geräte und Chemikalien
 - 2. Untersuchungsmaterial
 - 3. Untersuchungsgang
- C. Ergebnisse
- D. Diskussion
 - 1. Untersuchungsmethode
 - 2. Einflüsse von Infektionen und reaktiven entzündlichen Erkrankungen auf die Ingestion und Digestion
 - 3. Einflüsse von Dimethylsulfoxid auf die Ingestion und Digestion
 - 4. Eigene Untersuchungsergebnisse
 - 5. Erythrocytenphagocytose
- E. Zusammenfassung
- F. Literatur

Infektionserreger und unbelebte Partikel werden an der Cytoplasmamembran zur Phagocytose fähiger Zellen adhaerent und gelangen innerhalb kurzer Zeit durch einen Invaginationsprozeß - umschlossen von der Cytoplasmamembran der phagocytierenden Zelle - in das Zellinnere (Ingestion = Endocytose). Durch Abschnürung des Invaginates entsteht das Heterophagosom. Es ist umgeben vom Cytoplasma der phagocytierenden Zelle, jedoch von diesem getrennt durch die Cytoplasmamembran und damit dem Cytoplasma nicht zuzurechnen.

In der folgenden Phase bewegen sich die primären Lysosomen dem Heterophagosom zu. Es folgt eine Fusion der Membranen der primären Lysosomen und des Heterophagosoms, eine Kommunikation der Inhalte beider an der Membranfusion beteiligten Strukturen und damit die Möglichkeit des Überganges lysosomaler Enzyme und nichtenzymatischer Substanzen in das Heterophagosom. Durch den Mechanismus der Membranfusion ist gewährleistet, daß der Inhalt der primären Lysosomen in das Heterophagosom gelangt, ohne das Cytoplasma der phagocytierenden Zelle zu schädigen. Die so entstandene Struktur wird Heterophagolysosom genannt. Als Folge der Wirkung lysosomaler Enzyme auf das Phagocytat steigt der osmotische Druck innerhalb des Heterophagolysosoms, aus dem umgebenden Cytoplasma dringt Flüssigkeit ein, es bildet sich eine Digestionsvakuole.

Diese Struktur wird als cytoplasmatische Vakuole lichtmikroskopisch erkennbar. Ein Teil der in der enzymatischen Umsetzung entstandenen Metaboliten permeiert in das Cytoplasma der phagocytierenden Zelle, ein Teil verbleibt in der - in ihrem Volumen wieder abnehmenden - Digestionsvakuole, die dann als Restkörper bezeichnet wird. Der Inhalt des Restkörpers wird nach nochmaliger Fusion von Cytoplasma- und Restkörpermembran in den extrazellulären Raum eliminiert (Exocytose), oder der Restkörper bleibt in der phagocytierenden Zelle bis zu deren Untergang nachweisbar. Die Übergänge von Heterophagolysosomen zu Digestionsvakuolen und zu Restkörpern sind funktionell definiert und lichtmikroskopisch nicht zu trennen. Alle drei Funktionszustände imponieren als cytoplasmatische Vakuolen.

Eine Schädigung der Zelle durch die Enzyme der zell-eigenen primären und sekundären Lysosomen - wie sie von Weissmann und Mitarb. (1963, 1964) durch die Wirkung von Streptolysinen auf neutrophile Granulocyten im Experiment gezeigt wurde - wird durch eine hohe Stabilität der Lysosomenmembran oder bzw. und durch Vorliegen der Enzyme der primären Lysosomen in inaktiver Form vermieden. Die Fusion der Membranen der primären Lysosomen und des Heterophagosoms setzt eine Destabilisierung einer oder beider an der Fusion beteiligten Membranen voraus.

Das Ausmaß der Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen wird in den vorliegenden Phagocytoseversuchen als Ausdruck der Bildung von Heterophagolysosomen gedeutet und erlaubt damit Rückschlüsse auf das Ausmaß der Membranfusion und der Membrandestabilisierung.

In dem ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird die Abhängigkeit der Ingestion und der Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen in neutrophilen Granulocyten und Monocyten von akuten Infektionskrankheiten untersucht. Von speziellem Interesse war die Frage, ob in Leukocyten von Patienten mit akuten Infektionskrankheiten schneller und mehr cytoplasmatische Vakuolen pro ingestiertes Partikel entstehen als in Leukocyten von Patienten ohne Infektionskrankheiten. Weiterhin wird die Abhängigkeit der Ingestion und der Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen in neutrophilen Granulocyten und Monocyten von der Einwirkung der membrandestabilisierenden Substanz Dimethylsulfoxid (DMSO) untersucht. Neutrophile Granulocyten von Patienten mit Progressiver Septischer Granulomatose ingestieren Bakterien und Partikel normal, bilden jedoch bei Verwendung bestimmter Bakterien und Latexpartikeln nur eine geringe Zahl von Vakuolen (Holmes und Mitarb., 1966; Quie und Mitarb., 1967; Good und Mitarb., 1968). Die Digestion bestimmter Bakterien erfolgt in neutrophilen Granulocyten dieser erblichen Krankheit sehr stark verzögert (Holmes und Mitarb., 1966; Good und Mitarb., 1968). Einige Untersuchungs-

ergebnisse weisen darauf hin, daß die Fusion zwischen primären Lysosomen und Heterophagosom gestört ist (Holmes und Mitarb., 1966). In in-vitro-Versuchen konnte gezeigt werden, daß durch Zusatz von DMSO die Bildung von cytoplasmatischen Vakuolen in neutrophilen Granulocyten von Patienten mit Progressiver Septischer Granulomatose nach Ingestion von Latex-Partikeln induziert wurde. Es konnte gezeigt werden, daß funktionsfähige Digestionsvakuolen entstanden (Eschenbach und Mitarb., 1971).

Es wurde die Abhängigkeit der Ingestion und der Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen in neutrophilen Granulocyten und Monocyten hämatologisch gesunder Patienten von der Einwirkung von DMSO untersucht. Besonders sollte festgestellt werden, ob durch den Zusatz von DMSO die Ingestion von Latex-Partikeln und die Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen beschleunigt werden und ob die Zahl der entstandenen cytoplasmatischen Vakuolen pro ingestiertes Latex-Partikel zunimmt.

METHODISCHE ANGABEN UND UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Geräte und Chemikalien:

Auf 37 °C temperiertes Wasserbad, in dem in Schrägaufhängung 3 Glasröhrchen (10 ml) durch Elektromotoren um die Längsachse rotiert (30 U/Min) werden.

- Alle mit dem Blut in Berührung kommenden Glasgeräte wurden silikonisiert (3 %-ige Silikonöllösung in Tetrachlorkohlenstoff, Lufttrocknung, Einbrennung bei 300 °C während 3 Stunden).
- Bacto-Latex 0,8l der Firma Difco Lab., Detroit. Diese Bacto-Latex-Suspension wurde im Verhältnis 1 : 19 mit steriler, 0,15 m NaCl-Lösung verdünnt. 0,06 ml der verdünnten Latex-Suspension enthalten $85-90 \times 10^6$ Latex-Partikel.
- Dimethylsulfoxid reinst der Firma Serva, Heidelberg.
- Heparin der Firma La Roche, Grenzach (ca. 150 IE/mg).

UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Die Untersuchungen wurden im venösen Vollblut von Klein- und Schulkindern durchgeführt. In jeder der 4 Untersuchungsgruppen wurde das Blut von 7 Kindern untersucht. Folgende Einteilung der Untersuchungsgruppen wurde vorgenommen:

A. Klein- und Schulkinder ohne Infektionskrankheiten.

In dieser Gruppe wurden Kinder aufgenommen, die nach anamnestischen Angaben und klinischen Untersuchungsbefunden mindestens zwei Wochen frei von Infektionskrankheiten waren. Es wurde gefordert, daß eine normale Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, eine normale Leukocytenzahl und ein unauffälliges Differentialblutbild vorlagen. Außerdem wurde darauf geachtet, daß die Patienten im

Laufe eines Monats vor der Untersuchung keiner Impfung unterzogen worden waren.

B. Klein- und Schulkinder mit akuten, bakteriellen Infektionskrankheiten.

Für diese Untersuchungsgruppe wurden Patienten ausgewählt, die zum Zeitpunkt der Untersuchung nach anamnestischen Angaben, klinischen Befunden und Ergebnissen von Laboratoriumsuntersuchungen (BSG, Leukocytenzahl des peripheren Blutes, Differentialblutbild, ggf. Lumbalpunktat, Urinuntersuchungen) an einer akuten bakteriellen Erkrankung litten. Die Untersuchungen wurden vor Beginn - in einem Fall während der ersten 48 Stunden - der antibiotischen Behandlung vorgenommen. Bevorzugt wurden die Untersuchungen im Blut von Patienten mit bakteriellen Pneumonien, Meningitiden und Pyelonephritiden durchgeführt. Patienten mit chronischen Infektionskrankheiten wurden ausgesondert.

C. Klein- und Schulkinder mit akuten, viralen Infektionskrankheiten.

In dieser Gruppe wurden Kinder aufgenommen, die zum Zeitpunkt der Untersuchung nach anamnestischen Angaben, klinischen Befunden und Ergebnissen von Laboratoriumsuntersuchungen an einer akuten, viralen Erkrankung litten. Kinder, bei denen der Verdacht einer bakteriellen Superinfektion bestand, wurden ausgesondert. In dieser Gruppe sind besonders Kinder mit viralen, exanthematischen Erkran-

kungen und Parotitis epidemica vertreten.

D. Klein- und Schulkinder mit akuten, rheumatischen Erkrankungen

Ebenfalls nach den Angaben der Anamnese, Befunden der klinischen Untersuchungen und Ergebnissen von Laboratoriumsuntersuchungen wurden die Patienten dieser Untersuchungsgruppe ausgewählt. In dieser Gruppe sind besonders Patienten mit akutem rheumatischen Fieber, Chorea minor und rheumatischen Endo- und Endomyokarditiden vertreten.

UNTERSUCHUNGSGANG

5 ml venösen Blutes werden in ein silikonisiertes Glasröhrchen gegeben, in das 0,2 mg Heparin eingewogen sind. Durch leichtes Schwenken wird eine ausreichende Durchmischung erreicht. Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden folgende Ansätze vorgenommen:

1. 1 ml heparinisiertes Vollblut + 0,06 ml verdünnte Latex-Suspension,
2. 1 ml heparinisiertes Vollblut + 0,06 ml verdünnte Latex-Suspension + 0,02 ml DMSO (unverdünnt),
3. 1 ml heparinisiertes Vollblut + 0,02 ml DMSO (unverdünnt).

Nach sorgfältiger Durchmischung der Ansätze - ca. 3 Minuten nach Zusammengeben von Vollblut, DMSO und Latex-Suspension - Anfertigung von Ausstrichen, anschließend Beginn der Inkubation im Wasserbad bei 37 °C während Rotation der Reaktionsröhrchen um die

Längsachse. 15,30 und 60 Minuten nach Beginn des Ansatzes Entnahme von Blutproben und Anfertigung mehrerer dünner und homogener Ausstrichpräparate. Nach Lufttrocknung wurden die Präparate nach der Methode von Pappenheim gefärbt und nach vollständiger Trocknung mit Eukitt eingedeckt. Die Auswertung erfolgte mit Ölimmersion und Phasenkontrastverfahren (Vergr. 1 : 800).

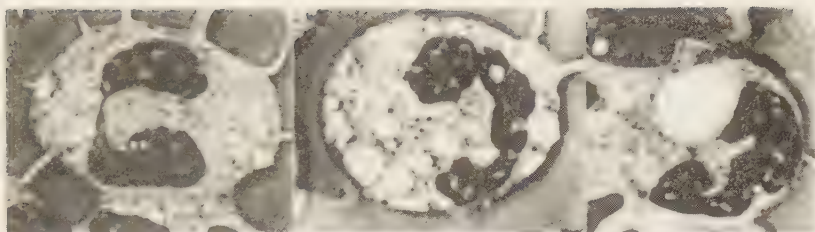
In den distalen 3/10 der Ausstrichfläche wurden in 100 unausgewählten neutrophilen Granulocyten und 20 Monocyten die ingestierten Latexpartikel und cytoplasmatischen Vakuolen gezählt. Berücksichtigt wurden ausschließlich nicht lädierte Zellen, deren Begrenzung sicher beurteilt werden konnte. Latexpartikel imponieren als runde, im Cytoplasma - teilweise in Vakuolen - lokalisierte, im Phasenkontrastverfahren homogen grünlich tingierte Aussparungen der cytoplasmatischen Struktur mit stets konstantem Durchmesser (Abb. 1).

Vakuolen sind scharf begrenzte, runde selten auch bizarr geformte Areale im Cytoplasma. Ihre Größe ist unterschiedlich und kann von Granulagröße bis Kerngröße reichen. Ein weiteres Charakteristikum ist die Granulavermehrung um die Vakuole. Gezählt wurden Vakuolen, die im gewählten Färbeverfahren entweder optisch leer erschienen oder unterschiedlich intensiv angefärbte, homogene oder inhomogene Strukturen zeigten (Abb. 1).

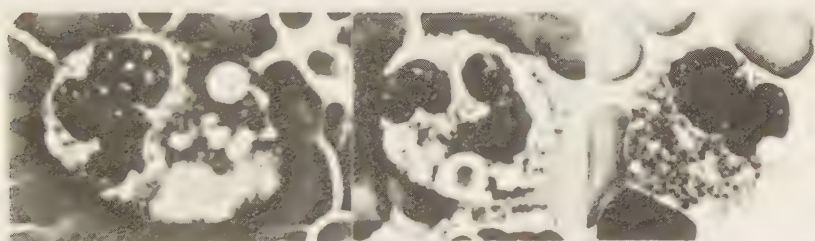
In dieser Untersuchung wurden ausschließlich Vakuolen gewertet, die einen Durchmesser von mindestens 2 Latexpartikeln hatten.

Von den ausgewerteten neutrophilen Granulocyten und Monocyten eines Blutausstriches wurden jeweils Summen und Mittelwerte der phagocytierten Latexpartikel und gebildeten cytoplasmatischen Vakuolen errechnet. Die errechneten Ergebnisse wurden durch dreifache Varianzanalyse auf ihre Signifikanz überprüft.

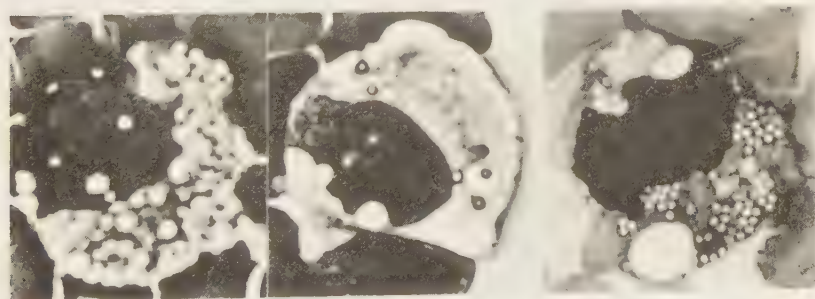
Die Berechnungen der statistischen Auswertung wurden im Institut für medizinisch-biologische Statistik und Dokumentation der Philipps-Universität Marburg (Direktor: Prof.Dr. P. Ihm) durchgeführt. Den Herren G.W. Himmelmann und M. Tücke danke ich für ihre Mithilfe und ihre Anregungen.



A - C



D - F



G - I

Legende nächste Seite

Abb. 1 Darstellung von ingestierten Latexpartikeln und cytoplasmatischen Vakuolen in neutrophilen Granulocyten (A-E), einem eosinophilen Granulocyten (F) und Monocyten (G-I) nach der beschriebenen in-vitro-Inkubation

Latexpartikel stellen sich als scharf begrenzte, runde, von einem dunklen Saum umgebene Aussparungen der Cytoplasmastruktur von stets gleichem Durchmesser dar, sie sind entweder solitär (A, B, H) oder in Gruppe (I) gelegen. Latexpartikel sind durch Granulaüberlagerungen in eosinophilen Granulocyten (F) nicht erkennbar. Cytoplasmatische Vakuolen sind als scharf begrenzte, teilweise runde, teilweise bizarr geformte Aussparungen der Cytoplasmastruktur unterschiedlicher Größe erkennbar. Sie sind bei Betrachtung im Phasenkontrastverfahren entweder optisch leer, enthalten Latexpartikel (B, H) oder inhomogenen oder homogenen Inhalt (G), nach Inkubation mit DMSO auch Erythrocyten bzw. Erythrocytenreste (E). Darstellung kleiner (A, G), mittelgroßer (B, F, H) und großer (C, E, I) cytoplasmatischer Vakuolen.

(Pappenheim-Färbung, Phasenkontrastverfahren, Vergr. 1 : 800)

ERGEBNISSE

Neutrophile Granulocyten und Monocyten ingestieren Latexpartikel und nach Zusatz von DMSO zum Inkubat Erythrocyten. Beide Leukocyten bilden nach der Ingestion cytoplasmatische Vakuolen. Die Ingestion von Latexpartikeln und die Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen durch bzw. in neutrophilen Granulocyten und Monocyten wurden quantitativ ausgewertet. Auf eine quantitative Auswertung der Erythrocyten-ingestion wurde verzichtet, sie trat zwar regelmäßig nach Zusatz von DMSO zum Inkubat auf, wurde aber nach 60 Minuten Inkubationsdauer nur in ca. 5 % der zur Phagocytose fähigen Leukocyten gefunden.

Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung der Ingestion von Latexpartikeln und die Entstehung von cytoplasmatischen Vakuolen beider untersuchter Leukocytenarten in Abhängigkeit von akuten Infektionskrankheiten ohne Zusatz von DMSO zum Inkubat sind in Abb. 2 und 3, mit Zusatz von DMSO zum Inkubat in Abb. 4 bis 7 dargestellt. Die Ergebnisse der statistischen Berechnungen sind in Tab. 1 wiedergegeben.

Den Angaben der Abb. 2 bis 7 und der Tab. 1 sind folgende Befunde zu entnehmen:

1. Die Zahl der ingestierten Latexpartikel und entstandenen cytoplasmatischen Vakuolen pro Einzelzelle steigen in neutrophilen Granulocyten und Monocyten mit und ohne Zusatz von DMSO zum Inku-

bat mit zunehmender Inkubationsdauer in allen Untersuchungsgruppen.

In der Varianzanalyse wurden für die Mittelwerte der Zahl der ingestierten Latex-Partikel und der entstandenen cytoplasmatischen Vakuolen beider untersuchter Leukocytenarten in Abhängigkeit von den Untersuchungszeiten hohe Signifikanzen berechnet (Tabelle 1 + 2).

2. In den Untersuchungsgruppen mit entzündlichen Erkrankungen (Untersuchungsgruppen B, C und D) war der Anstieg pro Zeiteinheit der Zahl der ingestierten Latexpartikel und der entstandenen cytoplasmatischen Vakuolen pro Einzelzelle während der Untersuchungsdauer von 60 Minuten höher als in der Untersuchungsgruppe ohne entzündliche Erkrankungen (Untersuchungsgruppe A).

In der Varianzanalyse wurden für die Mittelwerte der Zahl der ingestierten Latex-Partikel und der entstandenen cytoplasmatischen Vakuolen beider untersuchter Leukocytenarten in Abhängigkeit von den Untersuchungsgruppen hohe Signifikanzen berechnet (Tabelle 1 + 2).

3. In den Inkubationsansätzen ohne DMSO-Zusatz zeigten die neutrophilen Granulocyten die höchste Zahl der ingestierten Latexpartikel und entstandenen cytoplasmatischen Vakuolen pro Einzelzelle in der Gruppe der bakteriell bedingten Infektio-

nen (Abb. 2). Bei Vorliegen viral bedingter Infektionen wiesen Monocyten die höchsten Werte beider Parameter auf (Abb. 3).

4. Die Zahl der ingestierten Latexpartikel und entstandenen cytoplasmatischen Vakuolen pro Einzelzelle ist in Monocyten in allen Untersuchungsgruppen und zu jedem Zeitpunkt höher als in neutrophilen Granulocyten (Abb. 2 + 3). Dieser Befund ist unabhängig vom Zusatz von DMSO zum Inkubat (Abb. 4 + 7).

Die Ergebnisse der Absätze 3 und 4 wurden nicht auf Signifikanz überprüft, da sie nicht der Fragestellung dieser Arbeit entsprachen.

5. Die Zahl der ingestierten Latexpartikel steigt in der Zeiteinheit während der Inkubationsdauer von 60 Minuten in beiden untersuchten Leukocytenarten in allen Untersuchungsgruppen in den Inkubationsansätzen mit DMSO stärker als in den Ansätzen ohne DMSO.

In der Varianzanalyse wurden für die Mittelwerte der Zahl der ingestierten Latexpartikel in beiden untersuchten Leukocytenarten in Abhängigkeit von dem Zusatz von DMSO zum Inkubat hohe Signifikanzen berechnet (Tabelle 1 + 2).

Im Vergleich zu allen anderen Untersuchungsgruppen ist in der Gruppe der akuten, bakteriell be-

dingten Entzündungen die Differenz der Mittelwerte der Zahl der phagocytierten Latexpartikel pro Einzelzelle in neutrophilen Granulocyten zwischen den Inkubationsansätzen mit und ohne DMSO am geringsten (Abb. 4 + 6).

6. Die Zahl der entstandenen cytoplasmatischen Vakuolen pro Einzelzelle ist in neutrophilen Granulocyten und Monocyten in allen Untersuchungsgruppen nach einer Inkubationsdauer von mehr als 15 Minuten im 2. Inkubationsansatz (Vollblut und Latexpartikel und DMSO) größer als im 3. Inkubationsansatz (Vollblut und DMSO) und dieser wiederum größer als im 1. Inkubationsansatz (Vollblut und Latexpartikel). In den ersten 15 Minuten der Inkubation sind die Differenzen zu gering, um eine Beurteilung zu ermöglichen (Abb. 5 + 7).

In der Varianzanalyse wurden für die Mittelwerte der Zahl der entstandenen cytoplasmatischen Vakuolen in beiden untersuchten Leukocytenarten in Abhängigkeit von dem Zusatz von DMSO zum Inkubat hohe Signifikanzen berechnet (Tabelle 1 + 2).

7. Nach einer Inkubationsdauer von mehr als 3 Minuten steigt der Quotient Mittelwert der Zahl der cytoplasmatischen Vakuolen der Einzelzelle / Mittelwert der Zahl der ingestierten Latexpartikel der Einzelzelle für beide untersuchte Leukocytenarten nicht an. Der Zusatz von DMSO bewirkt für

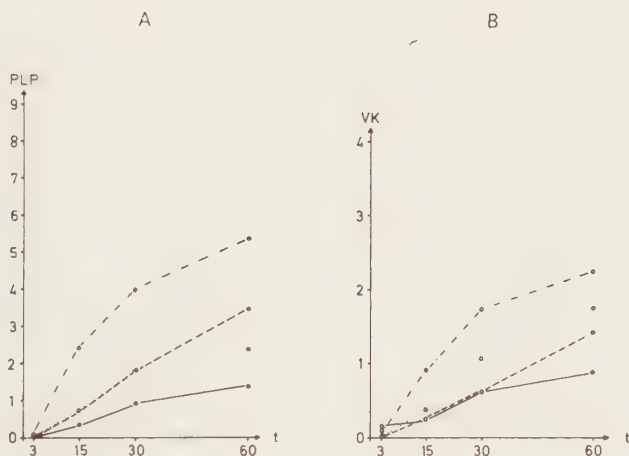


Abb.2 Ingestion von Latexpartikeln (A) und Entstehung von cytoplasmatischen Vakuolen (B) in neutrophilen Granulocyten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer im in-vitro-Versuch.
 PLP= Mittelwerte der ingestierten Latexpartikel/ Einzelzelle, VK= Mittelwerte der cytoplasmatischen Vakuolen/Einzelzelle, t= Inkubationsdauer (Min.),
 o—o = Untersuchungsgruppe A (ohne entzündliche Erkrankungen), o---o = Untersuchungsgruppe B (akute, bakteriell bedingte Erkrankungen), o....o = Untersuchungsgruppe C (akute, viral bedingte Erkrankungen), o- - -o = Untersuchungsgruppe D (akute, rheumatische Erkrankungen).

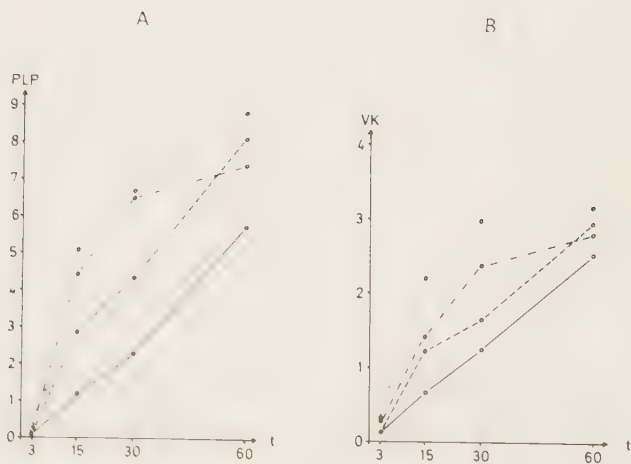


Abb.3 Ingestion von Latexpartikeln (A) und Entstehung von cytoplasmatischen Vakuolen (B) in Monocyten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer im in-vitro-Versuch.
Vgl. Legende der Abb.2.

Abb. 4 Wirkung von DMSO auf die Ingestion von Latexpartikeln durch neutrophile Granulocyten. PLP = Mittelwert der ingestierten Latexpartikel/Einzelle, t = Inkubationsdauer (Min.), A = Untersuchungsgruppe A (ohne entzündliche Erkrankungen), B = Untersuchungsgruppe B (akute, bakteriell bedingte Erkrankungen), C = Untersuchungsgruppe C (akute, viral bedingte Erkrankungen), D = Untersuchungsgruppe D (akute, rheumatische Erkrankungen), O ——— O = Vollblut und Latexpartikel kein DMSO im Inkubationsansatz, O ———— O = Vollblut, Latexpartikel und DMSO.

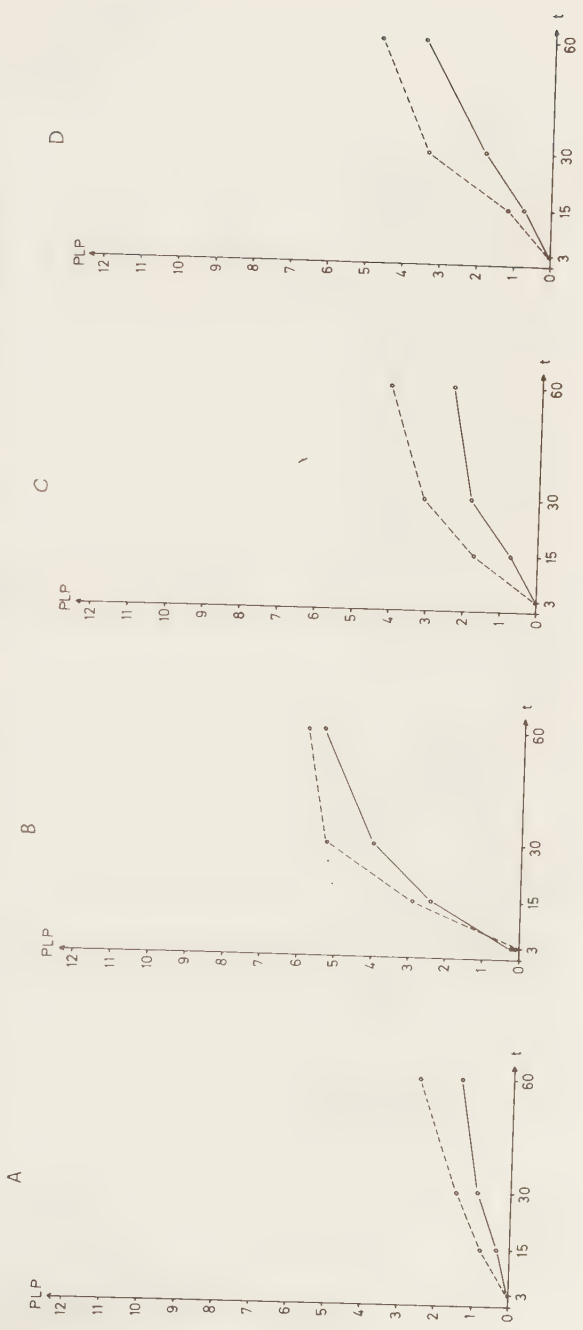


Abb.5 Wirkung von DMSO auf die Entstehung von cytoplasmatischen Vakuolen in neutrophilen Granulocyten. VK = Mittelwert der entstandenen Vakuolen/Einzelle, t= Inkubationsdauer (Min.), A= Untersuchungsgruppe A (ohne entzündliche Erkrankungen), B= Untersuchungsgruppe B (akute, bakteriell bedingte Erkrankungen), C= Untersuchungsgruppe C (akute, viral bedingte Erkrankungen), D= Untersuchungsgruppe D (akute, rheumatische Erkrankungen), o-----o = Vollblut und Latexpartikel,kein DMSO;o-----o = Vollblut,Latexpartikel und DMSO;o.....o = Vollblut und DMSO,keine Latexpartikel.

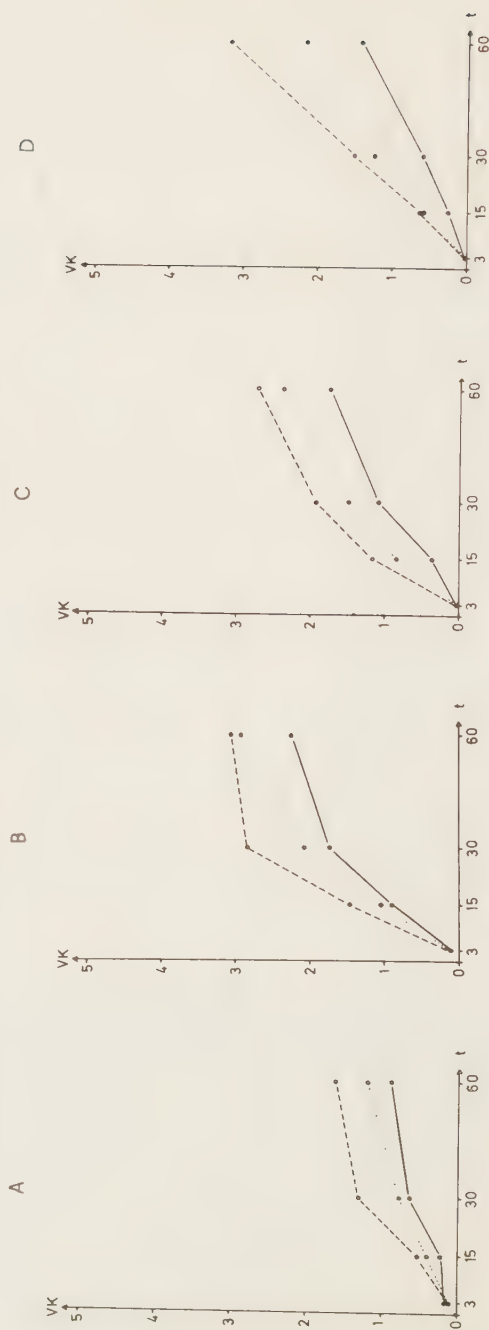


Abb.6 Wirkung von DMSO auf die Ingestion von Latexpartikeln durch Monocyten.
Vgl.Legende Abb.4.

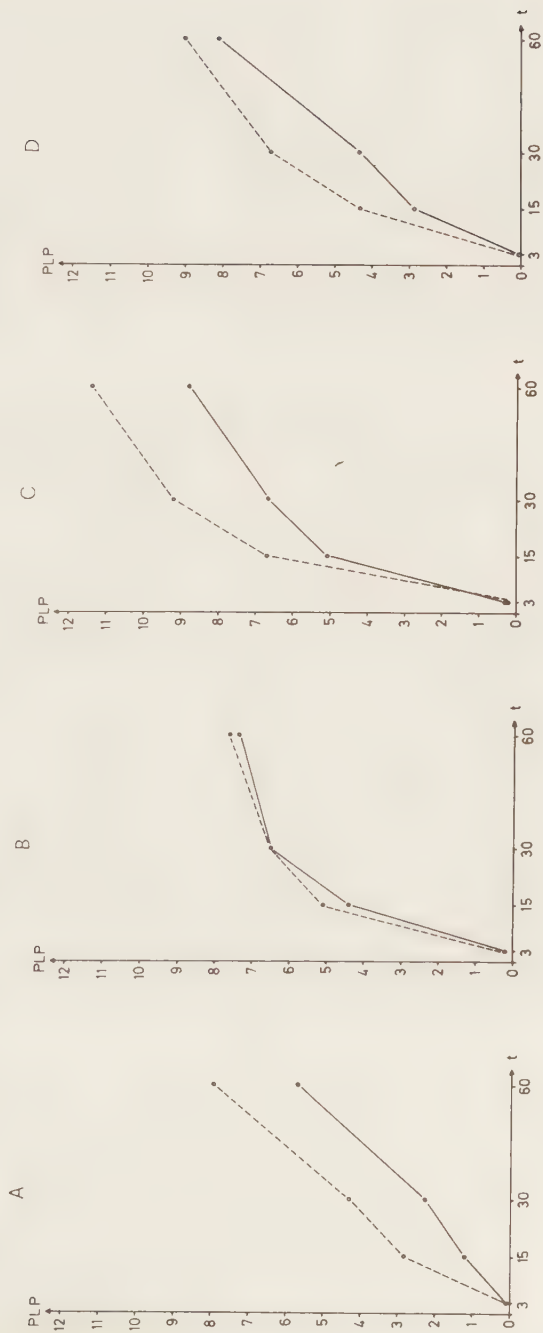
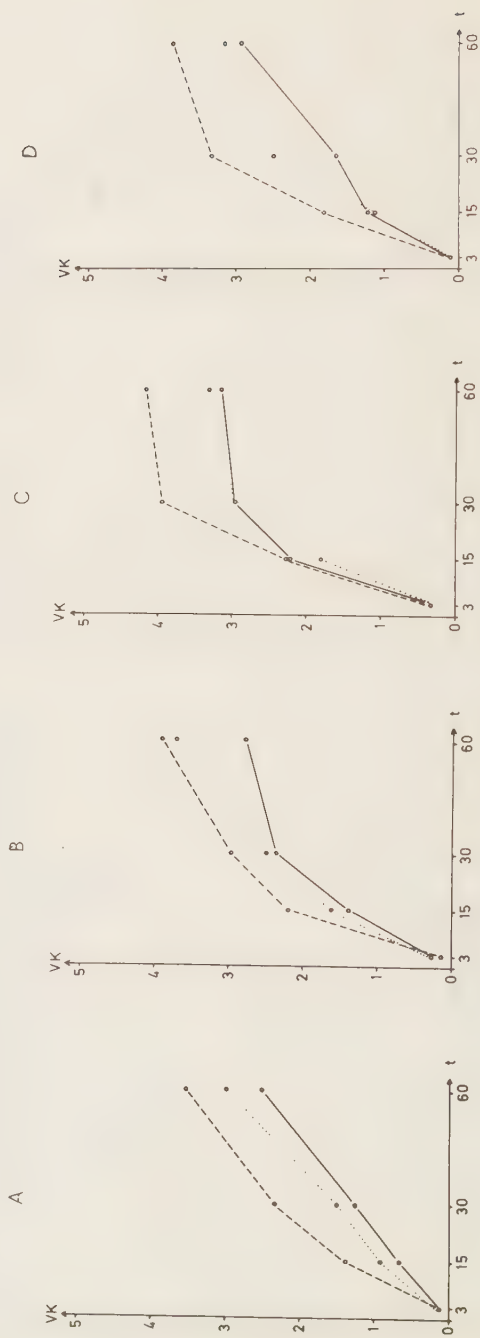


Abb.7 Wirkung von DMSO auf die Entstehung von cytoplasmatischen Vakuolen
in Monocyten. Vgl.Legende Abb.5.



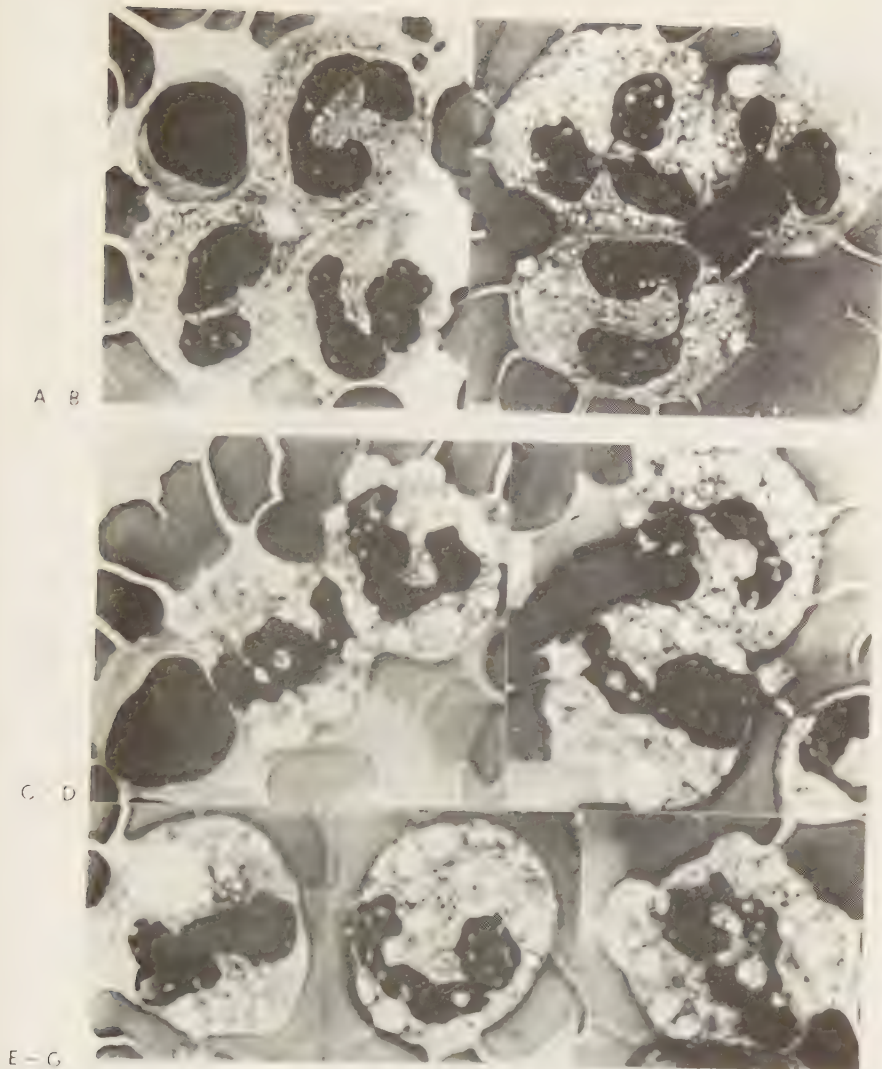


Abb. 8 Darstellung von ingestierten Latexpartikeln und cytoplasmatischen Vakuolen in neutrophilen Granulocyten (A-G) nach der beschriebenen in-vitro-Inkubation. A und B zeigen neutrophile Granulocyten aus einem Inkubationsansatz mit Latexpartikeln und ohne DMSO nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten. C-G zeigen neutrophile Granulocyten aus einem entsprechenden Inkubationsansatz mit DMSO.

Vgl. Legende der Abb. 1.

(Pappenheim-Färbung, Phasenkontrastverfahren, Verg. 1:800).

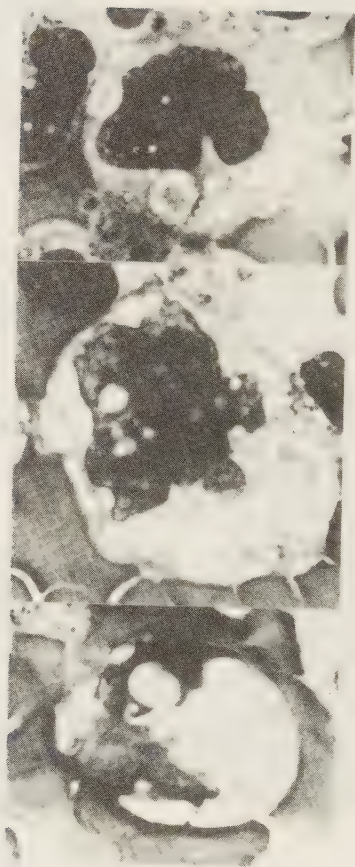


Abb.9 Darstellung von ingestierten Latexpartikeln und cytoplasmatischen Vakuolen in Monocyten aus einem Inkubationsansatz mit DMSO nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten.
Vgl.Legende Abb.1.

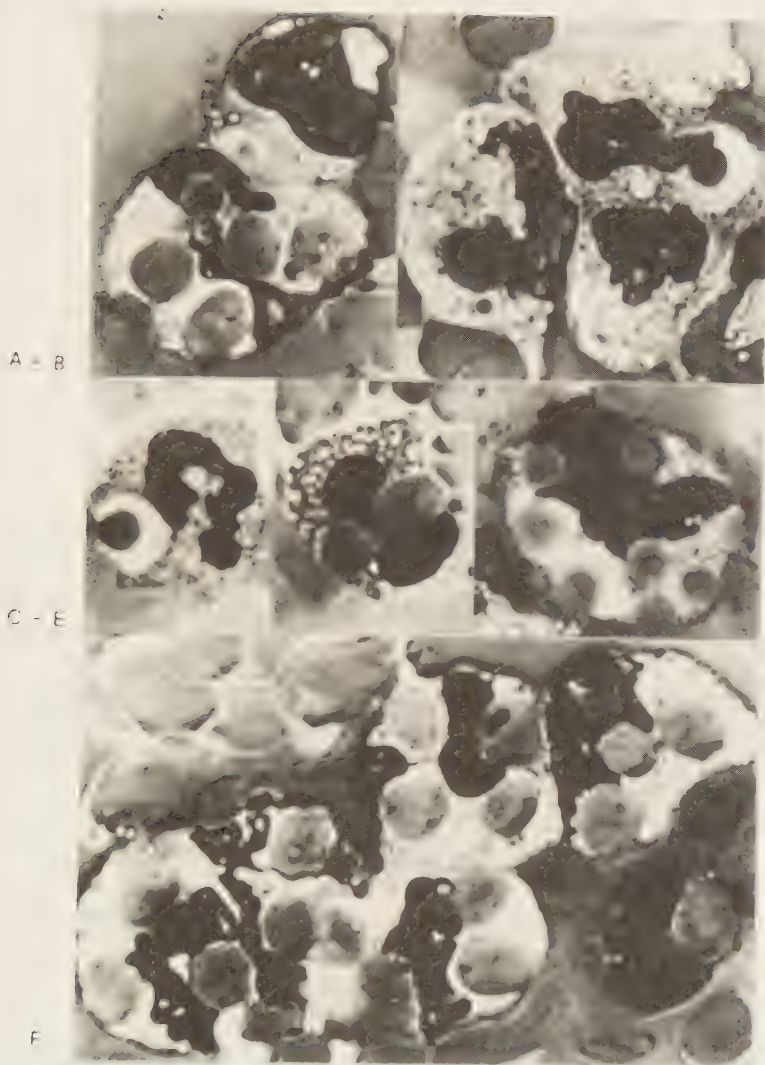


Abb. 10 Darstellung von ingestierten Erythrocyten, ingestierten Latexpartikeln und cytoplasmatischen Vakuolen in neutrophilen Granulocyten (A, B, C und F), einem eosinophilen Granulocyten (D) und Monocyten (E und F). Die ingestierten Erythrocyten liegen teilweise in großen Digestionsvakuolen (B und C), teilweise besitzen sie noch normale Zellgröße (A, D und F), manchmal sind die Erythrocyten geschrumpft (B, C und E) bei gleichzeitiger Erhöhung der Dichte (B und C) oder schon zu Erythrocytenresten abgebaut (B). Ein Monocyt mit acht ingestierten Erythrocyten (E).

Dreifache Varianzanalyse der Mittelwerte der Zahl der ingestierten Latex-Partikel in neutrophilen Granulocyten.

Variation	df	Quadrat- summen	$\bar{x}^2$	F	P	Signifikanz
1	3	60.88826	20.29609	389.93	<1%	xx
2	3	22.33172	7.44391	143.01	<1%	xx
3	1	4.10268	4.10268	78.82	<1%	xx
12	9	8.75822	0.97314	18.70	<1%	xx
13	3	1.90150	0.63382	12.18	<1%	xx
23	3	0.29392	0.09797	1.88	>5%	n.s.
RV	9	0.46845	0.05205			
T	31	98.74475				

Dreifache Varianzanalyse der Mittelwerte der Zahl der ingestierten Latex-Partikel in Monocyten.

Variation	df	Quadrat- summen	$\bar{x}^2$	F	P	Signifikanz
1	3	279.46020	93.15340	474.98	<1%	xx
2	3	35.82465	11.94155	60.89	<1%	xx
3	1	10.51226	10.51226	53.60	<1%	xx
12	9	15.52482	1.72498	8.80	<1%	xx
13	3	3.69904	1.23301	6.29	<5%	x
23	3	2.41146	0.80382	4.10	<5%	x
RV	9	1.76511	0.19612			
T	31	349.19753				

Variationen: 1= Untersuchungszeiten ($t_1=3$ min, $t_2=15$ min, $t_3=30$ min, $t_4=60$ min); 2= Untersuchungsgruppen (A= ohne entzündliche Erkrankungen; B= akute, bakterielle Erkrankungen; C= akute, virale Erkrankungen; D= akute, rheumatische Erkrankungen); 3= Inkubationsansätze (1= Vollblut und Latexpartikel, kein Dimethylsulfoxid; 2= Vollblut und Latexpartikel und Dimethylsulfoxid; 3= Vollblut und Dimethylsulfoxid); 12= Analyse der Variationen 1 und 2; 13= Analyse der Variationen 1 und 3; 23= Analyse der Variationen 2 und 3; RV= Restvarianz; T= total; n.s.= nicht signifikant, xx= hoch signifikant, x= signifikant

Dreifache Varianzanalyse der Mittelwerte der entstandenen Vakuolen in neutrophilen Granulocyten.

Variation	df	Quadrat- summen	$\bar{x}^2$	F	P	Signifikanz
1	3	29.44801	9.81600	371.82	<1%	xx
2	3	5.19975	1.73325	65.65	<1%	xx
3	2	3.11307	1.55654	58.96	<1%	xx
12	9	2.44820	0.27202	10.30	<1%	xx
13	6	1.37382	0.22897	8.67	<1%	xx
23	6	0.13283	0.02214	0.84	>5%	n.s.
RV	18	0.47524	0.02640			
T	47	42.19092				

Dreifache Varianzanalyse der Mittelwerte der entstandenen Vakuolen in Monocyten.

Variation	df	Quadrat- summen	$\bar{x}^2$	F	P	Signifikanz
1	3	65.90443	21.96814	695.0	<1%	xx
2	3	4.61918	1.53973	48.7	<1%	xx
3	2	3.70502	1.85251	58.7	<1%	xx
12	9	1.83801	0.20422	6.33	<1%	xx
13	6	1.71374	0.28652	9.05	<1%	xx
23	6	0.26473	0.04412	1.39	>5%	n.s.
RV	18	0.56818	0.03157			
T	47	78.61329				

Tabelle 3

UG	DMSO	NG			MC		
		15'	30'	60'	15'	30'	60'
A	-	0,64	0,70	0,64	0,50	0,54	0,47
	+	0,68	0,71	0,69	0,49	0,55	0,50
B	-	0,38	0,44	0,41	0,21	0,30	0,30
	+	0,25	0,54	0,51	0,43	0,47	0,51
C	-	0,51	0,60	0,74	0,25	0,47	0,30
	+	0,67	0,69	0,67	0,39	0,43	0,37
D	-	0,37	0,34	0,41	0,23	0,37	0,41
	+	0,54	0,58	0,64	0,40	0,50	0,45

Quotient - Mittelwert der Zahl der cytoplasmatischen Vakuolen der Einzelzelle / Mittelwert der Zahl der ingestierten Latexpartikel der Einzelzelle - gibt die Zahl der gebildeten Vakuolen pro ingestiertes Latexpartikel an. UG= Untersuchungsgruppen; DMSO= Dimethylsulfoxid; - = Inkubationsansatz ohne DMSO; + = Inkubationsansatz mit DMSO; NG= neutrophile Granulozyten; MC= Monocyten.

neutrophile Granulocyten in den Untersuchungsgruppen A, B und D einen Anstieg dieses Quotienten zu allen Untersuchungszeiten (größer als 3 Minuten). Für Monocyten konnte ein Anstieg des Quotienten ausschließlich in der Untersuchungsgruppe B zu allen Untersuchungszeiten festgestellt werden (Tabelle 3).

Die vorliegenden quantitativen Befunde ermöglichen folgende Aussagen:

Akute entzündliche Erkrankungen bewirken in neutrophilen Granulocyten und Monocyten einen Anstieg der Ingestion von Latexpartikeln und der Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen. Die höchsten Werte beider Parameter wurden in neutrophilen Granulocyten durch bakteriell bedingte, in Monocyten durch viral bedingte Erkrankungen erreicht. Die Mittelwerte beider Parameter waren für Monocyten stets höher als für neutrophile Granulocyten.

Dimethylsulfoxid-Zusatz zum Inkubat bewirkt in beiden untersuchten Leukocytenarten unabhängig von Entzündungen einen Anstieg der Zahl sowohl der ingestierten Latexpartikel als auch der cytoplasmatischen Vakuolen.

Die morphologischen Befunde nach Ingestion von Latexpartikeln und Erythrocyten und nach Entstehung von cytoplasmatischen Vakuolen sind in den Abb. 1 und

8 - 10 wiedergegeben. Latexpartikel wurden solitär oder in Gruppen angeordnet im Cytoplasma oder auch in cytoplasmatischen Vakuolen gesehen. Intravakuolär lokalisierte Latexpartikel zeigten auch nach längerer Inkubationsdauer erwartungsgemäß keinerlei Veränderungen. Durch einzelne neutrophile Granulocyten und Monocyten waren soviel Partikel ingestiert, daß das gesamte Cytoplasma prall gefüllt erschien, der Zellkern war dann häufig an die Zellmembran verdrängt und stark deformiert, Vakuolen wurden häufig nach derart intensiver Ingestion nicht gesehen. Latexpartikel wurden im Cytoplasma von Lymphocyten und basophilen Granulocyten nie, von eosinophilen Granulocyten vereinzelt angetroffen. Ihre Erkennung in eosinophilen Granulocyten ist durch die Überlagerung von den großen, eosinophilen Granula erheblich erschwert. In neutrophilen Granulocyten bestand diese Schwierigkeit - auch bei Bestehen toxischer Granulationen - nicht.

Die Größe der cytoplasmatischen Vakuolen ist unterschiedlich; sowohl große als auch kleine Vakuolen werden in einer Zelle beider untersuchter Leukocytenarten angetroffen.

Vakuolen entstehen in allen Bereichen des Cytoplasmas, eine bevorzugte Lokalisation innerhalb des Cytoplasmas war nicht erkennbar. Es wurden Einzelvakuolen sowohl in kernnahen als auch in kernfernen Cytoplasmaarealen angetroffen. Häufig wurden bizarre

Verformungen des Kernes (Abb. 9 C und 10) durch zahlreiche und großflächige Vakuolen beobachtet. Teilweise erschien die Zellmembran durch einzelne oder mehrere Vakuolen vorgetrieben. Bei einer Vielzahl von neutrophilen Granulocyten und Monocyten bestand der Eindruck, daß die Zellfläche im Ausstrichpräparat durch die Vakuolenentstehung zugenommen hätte.

Ein Teil der Vakuolen ließ bei der lichtmikroskopischen Betrachtung einen Inhalt nicht erkennen, die Vakuolen erschienen nach der Pappenheim-Färbung optisch leer. In einem anderen Teil der Vakuolen war ein Inhalt erkennbar. Wenige Vakuolen enthielten einzelne oder mehrere Latexpartikel. In anderen Vakuolen bestand der Inhalt aus mehr oder weniger inhomogenem, schwach basophil oder acidophil angefärbtem Material. Teilweise war eine feingranuläre Struktur sichtbar.

Vakuolen in stark angefärbten Cytoplasmaarealen waren stets scharf begrenzt, in nur schwach angefärbten Arealen erschien die Vakuolenkontur gelegentlich unscharf. Ihre Form war vorwiegend rund oder oval. In Zellen mit zahlreichen Vakuolen kam es zu Deformierungen, jedoch nur selten wurden bizarre Vakuolenformen beobachtet.

Eine Anreicherung der cytoplasmatischen Granula um Vakuolen bei Verminderung der Granulation im übrigen

Cytoplasma wurde in neutrophilen Granulocyten häufig gesehen (Abb. 1 D). Eine entsprechende Granulaver-schiebung in eosinophilen Granulocyten wurde nicht ausgemacht.

Von besonderem Interesse ist das Phänomen der Erythrocytenphagocytose unter dem Einfluß von DMSO in der angewendeten Versuchsanordnung. In den Ausstrichpräparaten der Ansätze mit DMSO (Vollblut + Latexpartikel + DMSO und Vollblut + DMSO) wurden ingestierte Erythrocyten in Monocyten und neutrophilen Granulocyten - selten auch in eosinophilen Granulocyten - gefunden (Abb. 1 und 10). Die ingestierten Erythrocyten waren teilweise intravakuolär (Abb. 1E, 10 A - C und E) lokalisiert oder lagen im Cytoplasma, ohne daß sich eine Vakuole gebildet hatte. Die intravakuolär lokalisierten Erythrocyten zeigten vielfältige Veränderungen, die auf Abbauvorgänge hinweisen: Abnahme des Durchmessers (Abb. 1 E, 10 A, B und C), Zunahme der Dichte (Abb. 1 E, 10 A - C), Abnahme der Schärfe der Kontur (Abb. 10 E) und Inhomogenität des Stroma. In einigen neutrophilen Granulocyten und Monocyten konnten Phagocytatreste nur mit Hilfe der Lepehne-Färbung als Reste von Erythrocyten identifiziert werden.

In einzelnen phagocytierenden Leukocyten wurden Strukturen gefunden, die nach Pappenheim-Färbung die Größe, Struktur und Anfärbung von Thrombocyten aufwiesen. Eine exakte Identifizierung dieser Strukturen

als Thrombocyten gelang jedoch nicht.

DISKUSSION

1. Diskussion der Untersuchungsmethode

Untersuchungen der Ingestion und Digestion durch Leukocyten des peripheren Blutes wurden bereits zahlreich durchgeführt. Vorwiegend wurden separierte Leukocyten verwendet. In den vorliegenden Untersuchungen wurde Vollblut gewählt, also auf die Leukocytenseparation verzichtet. Dadurch sollte jeglicher Einfluß der für die Separation erforderlichen Substanzen auf die Zell-, Phagosomen- und Lysosomenmembran, den Zellstoffwechsel usw. vermieden werden. Wahrscheinlich bietet das gewählte Verfahren auch dadurch einen Vorteil, daß mechanische Alterationen z.B. durch Zentrifugieren und Resuspendieren während der Separation ausgeschlossen werden. Weiterhin war die Überlegung von Bedeutung, daß Leukocyten in Vollblut weniger rasch in die Situation des Sauerstoffmangels geraten als Leukocyten, die in erythrocytenfreien Elektrolyt-Glukose-Lösungen suspendiert sind. Ferner sollte der Zeitraum zwischen Blutentnahme und Beendigung der Untersuchung so klein wie möglich gehalten werden, da durch bisher unveröffent-

lichte Untersuchungen gezeigt werden konnte, daß in defibriniertem Blut nach einer Lagerung von 2 Stunden bei einer Temperatur von 37 °C bereits spontan - also ohne Ingestion von Latexpartikeln - cytoplasmatische Vakuolen auftreten (Eschenbach und Mitarb.). Die Minimaldauer (Zeit der Erythrocytensedimentation) der Leukocytenseparation beträgt ca. 50 Minuten (Barthelmai und Mitarb., 1971).

In der beschriebenen Untersuchungsmethode wurde dem Blut lediglich Heparin in einer Konzentration von 4 mg-% zugesetzt. Nach Untersuchungen von Allgöwer (1947) bewirkt Heparin in Leukocyten eine Verminderung der Phagocytosekapazität in Konzentrationen von mehr als 40 mg-%. In der verwendeten Heparinkonzentration ist nach diesem Autor ein Einfluß auf die Ingestion und Digestion nicht zu erwarten.

Das angegebene Verfahren wurde gewählt, um jegliche störenden Einflüsse weitgehend zu vermeiden.

Ein Nachteil des Untersuchungsverfahrens ist darin zu sehen, daß in jedem Ansatz ein unbekannter und wahrscheinlich wechselnder Anteil der Latexpartikel an Thrombocyten adhärent oder durch Thrombocyten ingestiert wird und somit der Ingestion durch Leukocyten verloren geht. Latexpartikel wurden deswegen - unabhängig von der absoluten Zahl der phagocytierenden Leukocyten - im Überschuß ($85 - 95 \times 10^6$ Latexpartikel/ 1 ml Vollblut) zugesetzt. Zudem stand im

Mittelpunkt des Interesses nicht die Kapazität der Ingestion unter den verschiedenen Versuchsbedingungen - die Ingestion hat nur eine indirekte Bedeutung, da sie Voraussetzung für die Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen ist -, sondern das Verhältnis der Zahl der entstandenen cytoplasmatischen Vakuolen in bezug auf die Zahl der ingestierten Latexpartikel in Abhängigkeit von Entzündungsvorgängen und der Einwirkung von DMSO.

Als Phagocytat wurden die biochemisch inerten Latexpartikel gewählt, da das Phagocytat einen Einfluß auf den Vorgang der Digestion ausübt (Mandell und Mitarb., 1969; Hawiger und Mitarb., 1969). Dieser Einfluß sollte weitgehend ausgeschlossen werden. Nachteilig machte sich der geringe mittlere Durchmesser von $0,81 \mu$ der verwendeten Latexpartikel bemerkbar, wenn durch eine Zelle eine Vielzahl von Partikeln ingestiert worden waren und ihre Zahl wegen starker Überlagerungen nicht genügend genau bestimmt werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der Zahl der ingestierten Latexpartikel lediglich die Zahl der entstandenen cytoplasmatischen Vakuolen in Abhängigkeit von Entzündungsprozessen und der Einwirkung von DMSO untersucht. Nicht berücksichtigt wurde die Fläche der cytoplasmatischen Vakuolen unter den genannten Bedingungen. Diese Untersuchungen sind vorgesehen. Entsprechende Untersuchungen an neutro-

philen Granulocyten und Monocyten von zwei Kindern mit Progressiver Septischer Granulomatose ließen unter dem Einfluß von DMSO eine stärkere Zunahme der Vakuolenfläche als der Vakuolenzahl der neutrophilen Granulocyten erkennen (Eschenbach und Mitarb., 1971).

2. Diskussion der Einflüsse von Infektionen und reaktiven entzündlichen Erkrankungen auf die Ingestion und Digestion

Die Ingestion von Erregern durch phagocytierende Leukocyten kann durch eine Alteration des Phagocytates z.B. durch Wirkung von Opsoninen (Miller und Mitarb., 1968) einerseits und durch Stimulation bzw. Inhibition der Ingestionskapazität der phagocytierenden Zelle andererseits beeinflusst werden. Über die Anpassung beider die Ingestion beeinflussenden Komponenten an entzündliche Erkrankungen liegen im Schrifttum keine Angaben vor. Meines Wissens ist selbst die Frage, ob während entzündlicher Krankheiten die Ingestion von Erregern oder unbelebten Partikeln überhaupt rascher abläuft oder insgesamt intensiver erfolgt, bisher nicht bearbeitet.

Eine Stimulation der Digestion von ingestierten Erregern und unbelebten Partikeln durch phagocytierende Leukocyten durch bzw. während entzündlicher Erkrankungen ist auf dem Wege der Steigerung der Synthese lysosomaler Enzyme und Steigerung der Permeabilität bzw. Destabilisierung der Lysosomenmembran

und dadurch Steigerung der Fusionskapazität möglich. Von Suter und Mitarb. (1960), Thorbecke und Mitarb. (1961), Cohn und Mitarb. (1960), Heise und Mitarb. (1965) und Saito und Mitarb. (1965) wurden in Exsudatzellen BCG-geimpfter Versuchstiere höhere Gesamtaktivitäten lysosomaler Enzyme gefunden als in entsprechenden Zellen nicht geimpfter Tiere. Heise und Mitarb. (1965) beschrieben für saure Phosphatase, Lysoszym und Cathepsin einen von der BCG-Dosis abhängigen Aktivitätsanstieg in Alveolarmakrophagen von Kaninchen. Eschenbach (1971) zeigte, daß während akuter bakterieller und viraler Infektionen das lysosomale Enzym saure Desoxyribonuclease in Leukozyten des peripheren Blutes vermehrt synthetisiert wird. Von Allison und Mitarb. (1963, 1965) wurde ein Anstieg der Gesamtaktivität mehrerer lysosomaler Enzyme (β -Glucuronidase, saure Phosphatase, Protease, saure Ribonuclease und Desoxyribonuclease) in Kulturzellen nach Virusinfektionen der Kultur mitgeteilt. Dannenberg und Mitarb. (1963) fanden einen Anstieg lysosomaler Enzyme in mononucleären Exsudatzellen in in-vitro-Kulturen nach Ingestion mit Hefepartikeln während der Phase der protoplasmatischen Adaptation. Den referierten Veröffentlichungen ist zu entnehmen, daß die Infektion eines Organismus und die Ingestion von Erregern u.a. mit einer Steigerung der Synthese lysosomaler Enzyme beantwortet wird.

Eine Zunahme der Permeabilität der Membranen der

primären Lysosomen durch die Einwirkung von Streptolysin S und O wurden von Weissmann und Mitarb. (1963, 1964), Hirsch und Mitarb. (1963) und Weissmann (1964 a + b) beschrieben. Infektionen von Zellkulturen durch Viren führten zu einer vermehrten Freisetzung lysosomaler Enzyme (Allison und Mitarb., 1963, 1965; Wolff und Mitarb., 1964; Mallucci und Mitarb., 1965; Flanagan, 1966). Durch virusfreie Extrakte aus Zellen virusinfizierter Kulturen erhielten Thacore und Mitarb. (1968) eine Freisetzung der β -Glucuronidase aus isolierten Lysosomen. Durch cytochemische Untersuchungen von Leukocyten der peripheren Blutes wurde durch Eschenbach (1971) gezeigt, daß während akuter bakterieller und viraler Infektionen die Permeabilität der primären Lysosomen gesteigert ist.

Durch die referierten Ergebnisse kann nicht belegt werden, daß die Digestion durch Infektionen bzw. entzündliche Prozesse verstärkt wird. Es wird aber belegt, daß die Voraussetzungen der Digestion - Enzymsynthese und Membrandestabilisierung - stimuliert werden. Die direkte Abhängigkeit der Stimulation der Digestion durch Infektionen ist meines Wissens bisher nicht bearbeitet.

3. Diskussion des Einflusses von DMSO auf die Ingestion und Digestion

Über den Einfluß von DMSO auf die Ingestion und Digestion liegen meines Wissens im Schrifttum - außer

einer Veröffentlichung von Eschenbach und Mitarb. (1971) - keine Angaben vor. Die Wirkung von DMSO auf Zell- und Organellenmembranen ist mehrfach beschrieben worden: Altland und Mitarb. (1966) zeigten eine Steigerung der Permeabilität von Organellenmembranen durch DMSO, Misch und Mitarb. (1969) wiesen eine Steigerung der Permeabilität der Lysosomenmembran der Leberparenchymzellen für das Substrat der sauren Phosphatase, Na- β -Glycerophosphat, durch DMSO nach. Gander und Mitarb. (1969) bestätigten diese Wirkung von DMSO auf Lysosomenmembranen. Eschenbach (1970) fand, daß in neutrophilen Granulocyten von Patienten mit Progressiver Septischer Granulomatose im cytochemischen Verfahren lysosomale Desoxyribonuclease in nur stark verminderter Aktivität nachweisbar ist, durch Zusatz von DMSO zur Inkubationslösung oder Vorinkubation der Ausstrichpräparate in DMSO-Lösung wurde die Nachweisbarkeit des Enzyms normalisiert, ebenfalls von Eschenbach (1971) wurde durch Zusatz von DMSO zur Inkubationslösung eine Steigerung der Nachweisbarkeit der lysosomalen Desoxyribonuclease in Leukocyten hämatologisch gesunder Patienten erreicht. Ferner wurde von Gerhards (1967) eine konzentrationsabhängige Hämolyse von Erythrocyten durch DMSO nachgewiesen.

Der Wirkungsmechanismus des DMSO auf Membranen ist bisher nicht geklärt, die Hypothesen über die Wirkung sind in Veröffentlichungen von Gerhards und

Mitarb. (1968), Ghajar und Mitarb. (1968) und Hamaguchi (1964) dargelegt. In diesem Zusammenhang ist ebenfalls eine Untersuchung von Sommer und Mitarb. (1964) anzuführen.

Von der Vorstellung ausgehend, daß eine Steigerung der Membranpermeabilität gleichbedeutend sein könnte mit einer Steigerung der Membrandestabilisierung und damit einer Steigerung der Kapazität der Fusion zwischen primären Lysosomen und Phagosomen, wurde von Eschenbach und Mitarb. (1971) der Einfluß von DMSO auf die Entstehung von cytoplasmatischen Vakuolen in neutrophilen Granulocyten und Monocyten von Patienten mit Progressiver Septischer Granulomatose durchgeführt.

Diese erbliche, meistens bereits im Kindesalter zum Tode führende Erkrankung ist charakterisiert durch eine Insuffizienz der Digestionsfähigkeit der neutrophilen Granulocyten und - zumindest bei einem Teil der Patienten - auch der Monocyten für bestimmte bakterielle Erreger und Fungi (vgl. Good und Mitarb., 1968). Ob der die Pathogenese entscheidende Ausfall in der Unfähigkeit zur Fusion zwischen primären Lysosomen und Heterophagosom zu sehen ist, läßt sich bisher nicht entscheiden. Von mehreren Autoren wird die mangelnde Fusion beider Organellen, die stark verminderte Bildung cytoplasmatischer Vakuolen und die fehlende Degranulation der neutrophilen Granulocyten in den Mittelpunkt der Betrachtungen gestellt (Holmes und Mitarb., 1966; Quie und Mitarb., 1967; Good und Mitarb., 1968; Kaplan und Mitarb., 1968; Andersen und Mitarb., 1968; Thompson und Mitarb., 1969; Hitzig und Mitarb., 1969), von anderen Autoren wurden normale Vakuolenbildung und Degranulation bei fehlender Digestion der Erreger durch neutrophile Granulocyten in entsprechender Versuchsanordnung beschrieben (Kauder und Mitarb., 1968; Mandell und Mitarb., 1969; Douglas und Mitarb., 1969).

Die neutrophilen Granulocyten der beiden Patienten mit Progressiver Septischer Granulomatose, die von Eschenbach und Mitarb. (1971) untersucht wurden, ingestierten Latexpartikel normal, bildeten jedoch innerhalb von 30 Minuten Inkubationsdauer nur eine geringe Zahl cytoplasmatischer Vakuolen mit einer nur geringen Vakuolenfläche pro Einzelzelle im Ansatz ohne DMSO-Zusatz. Dagegen war die Zahl und Fläche der Vakuolen der neutrophilen Granulocyten im Ansatz mit DMSO-Zusatz wesentlich gesteigert. Daß es sich um funktionsfähige Phagolysosomen handelte, konnte an den unter der Wirkung von DMSO ingestierten Erythrocyten gezeigt werden. Die Vakuolenbildung der Monocyten wich in den zwei untersuchten Fällen nicht von der Norm ab. Weder die Zahl noch die Fläche der Vakuolen wurde durch Zusatz von DMSO beeinflusst. Am Beispiel dieser pathologischen Fälle konnte also gezeigt werden, daß durch DMSO im in-vitro-Phagocytoseversuch die Bildung von Phagolysosomen entscheidend gesteigert werden konnte. In diesen Fällen führte also DMSO zu einer Destabilisierung der Membran der primären Lysosomen oder bzw. und der Heterophagosomen. Die Ergebnisse entsprechen den Untersuchungen an phagocytierenden Leukocyten hämatologisch gesunder Personen werden in der vorliegenden Arbeit mitgeteilt.

4. Diskussion der eigenen Untersuchungsergebnisse

Die Ergebnisse lassen erkennen, daß neutrophile Granulocyten und Monocyten, die Patienten mit akuten Entzündungen verschiedener Genese entnommen wurden, in der Zeiteinheit mehr Latexpartikel ingestieren als die eines Patienten ohne entzündliche Erkrankungen. Die Frage, ob Infektionen des Organismus die Ingestion von Partikeln durch phagocytierende Leukocyten beeinflussen, läßt sich dadurch beantworten: akute Infektionen stimulieren die Ingestion von Latexpartikeln durch neutrophile Granulocyten und Monocyten. Bei Vorliegen bakterieller Infektionen ist die Stimulation der Ingestion der neutrophilen Granulocyten stärker als die der Monocyten, bei viralen Infektionen ist die der Monocyten stärker als die der neutrophilen Granulocyten.

Der Makroorganismus reagiert also nicht nur mit einer Änderung der Gesamtleukocytenzahl und einer Verschiebung des Differentialblutbildes - also mit einer Änderung der Leukocytenkinetik - sondern auch durch Stimulation der Ingestion des einzelnen phagocytierenden Leukocyten.

Den vorliegenden Ergebnissen ist weiterhin zu entnehmen, daß der Zusatz von DMSO zum Inkubat ebenfalls zu einer Steigerung der Ingestion von Latexpartikeln durch beide untersuchte Leukocytenarten führt. Diese Wirkung von DMSO wurde in neutrophilen Granulocyten und Monocyten von Patienten sowohl mit wie ohne In-

fektionen registriert. Wie in beiden Untersuchungsgruppen die Stimulation erfolgt, läßt sich nach den vorliegenden Ergebnissen nicht entscheiden. Wahrscheinlich spielen Veränderungen der Oberfläche der ingestierenden Zelle und bzw. oder des ingestierten Partikels bei diesem Vorgang eine Rolle.

Die quantitative Auswertung der Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen während der Inkubation zeigt, daß neutrophile Granulocyten und Monocyten von Patienten mit akuten Entzündungen in der Zeiteinheit eine höhere Zahl cytoplasmatischer Vakuolen bilden als die entsprechenden Zellen von Patienten ohne entzündliche Erkrankungen. Die unterschiedliche Reaktion von neutrophilen Granulocyten und Monocyten auf bakteriell und viral bedingte Entzündungen entspricht der der Ingestion. Der Quotient Mittelwert der Zahl der cytoplasmatischen Vakuolen der Einzelzelle / Mittelwert der Zahl der ingestierten Latexpartikel der Einzelzelle wird durch akute Infektionen weder für die neutrophilen Granulocyten noch für die Monocyten geändert.

Diese Ergebnisse lassen erkennen, daß in der gewählten Versuchsanordnung die Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen nicht direkt durch Infektionen, sondern nur indirekt durch eine Steigerung der Ingestion stimuliert wird. Aus Veröffentlichungen von Sbarra und Mitarb. (1959) und Karnovsky (1962) ist

die Abhängigkeit der für die Digestion erforderlichen Stoffwechselvorgänge von der Ingestion bekannt. Infektionen steigern also die Fähigkeit der Fusion von Lysosomen- und Heterophagosomenmembranen nicht direkt.

Der Zusatz von DMSO zum Inkubat steigert dagegen die Entstehung von cytoplasmatischen Vakuolen in neutrophilen Granulocyten stärker als es der Zahl der ingestierten Latexpartikel entspricht. Der genannte Quotient steigt durch Zusatz von DMSO für neutrophile Granulocyten. Für Monocyten war ein Anstieg des Quotienten lediglich in der Untersuchungsgruppe der akuten bakteriellen Infektionen gegeben. DMSO erhöht folglich die Kapazität der Fusion von Lysosomen- und Heterophagosomenmembranen. Diese Aussage ist für Monocyten nicht zu machen. Dieser Befund der DMSO-Wirkung an neutrophilen Granulocyten steht in guter Übereinstimmung mit den bereits zitierten Ergebnissen von Eschenbach und Mitarb. (1971) an neutrophilen Granulocyten von Patienten mit Progressiver Septischer Granulomatose. Bei dieser Erkrankung liegt offenbar eine pathologische Verminderung der Fusionskapazität der neutrophilen Granulocyten - in speziellen Fällen auch der Monocyten - vor. Dieser Defekt kann durch die Wirkung von DMSO weitgehend aufgehoben werden. Der Effekt des DMSO auf die Vakuolenbildung ist in neutrophilen Granulocyten dieser Patienten besonders ausgeprägt. Erklär-

licherweise kann er in den entsprechenden Zellen hämatologisch gesunder Patienten nur sehr viel geringer sein.

5. Erythrocytenphagocytose

Erythrocytenphagocytose durch Leukocyten des peripheren Blutes (Monocyten, neutrophile und eosinophile Granulocyten) sind mehrfach beschrieben: Ehrlich (1881), Zinkham und Mitarb. (1952), Jordan und Mitarb. (1952), Conway (1953), Bonnin und Mitarb. (1954), Schubotho und Mitarb. (1955), Gerlings-Petersen und Mitarb. (1962), Greendyke (1963), Archer (1965), Rabinowitch (1967), Huber und Mitarb. (1969), Pearlman (1969). Diesen Veröffentlichungen gemeinsam ist, daß der Erythrocytenphagocytose eine immunologisch bedingte Schädigung der Erythrocyten vorausgegangen ist. Von Schubotho und Mitarb. (1955) wird die Erythrocytenphagocytose als ein Kriterium in der Differentialdiagnose hämolytischer Anämien angegeben. Es kann bisher nicht angegeben werden, ob die durch DMSO induzierte Erythrocytenphagocytose durch eine Schädigung der Erythrocytenmembran oder bzw. und durch eine Steigerung der Ingestionskapazität der Leukocyten ausgelöst wird. Daß DMSO zu einer Schädigung der Erythrocytenmembran führt, wurde von Gerhards und Mitarb. (1967) beschrieben. Auch in den eigenen Versuchsansätzen wurde - nach Abschluß der Inkubation - teilweise die Sedimentation abgewartet

bzw. das Inkubat zentrifugiert und eine wechselnd stark ausgeprägte Hämolyse beobachtet. Der Hämoglobingehalt des Überstandes wurde nur stichprobenhaft bestimmt, in der Regel war Hämoglobin im Überstand nachweisbar. Andererseits wird durch die vorliegenden Ergebnisse belegt, daß durch Zusatz von DMSO zum Inkubat die Ingestionsfähigkeit der phagocytierenden Leukocyten gesteigert wird. Der Befund der Erythrocytenphagocytose hat insofern für die gesamte Untersuchung ein Interesse, als damit nachgewiesen werden konnte, daß es sich bei den entstandenen, cytoplasmatischen Vakuolen um funktionsfähige Heterophagolysosomen handelt. Bereits nach einer Inkubationsdauer von 15 Minuten wurden in den Inkubationsansätzen mit DMSO-Zusatz weitgehend digestierte Erythrocyten gefunden. Teilweise konnte der Inhalt von Vakuolen nur mit Hilfe der Lepehne-Färbung als Erythrocytenrest identifiziert werden. Die unter der Wirkung von DMSO entstandenen Vakuolen sind also nicht als funktionslose Artefakte anzusehen.

ZUSAMMENFASSUNG

Neutrophile Granulocyten und Monocyten von Patienten mit akuten, bakteriell, viral und reaktiv bedingten Entzündungen ingestieren Latexpartikel rascher und insgesamt stärker als entsprechende Zellen von Patienten ohne entzündliche Erkrankungen. Entsprechend schneller und intensiver werden cytoplasmatische Vakuolen gebildet. Ingestion und Digestion durch phagocytierende Leuko-
cyten werden durch Entzündungen intensiviert.

Durch Zusatz von Dimethylsulfoxid werden sowohl die Ingestion als auch die Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen als Ausdruck der Digestion verstärkt. Monocyten, neutrophile und eosinophile Granulocyten ingestieren und digestieren unter der Einwirkung von Dimethylsulfoxid im in-vitro-Versuch Erythrocyten. Die intravakuoläre Digestion der Erythrocyten weist auf die Funktionsfähigkeit der unter der Wirkung von Dimethylsulfoxid entstandenen cytoplasmatischen Vakuolen hin. Damit ist ihre Identität mit Heterophagolysosomen gezeigt.

LITERATUR

1. Allgöwer, M.: Über die Wirkung von Heparin, poly-anetholsulfosaurem Natrium und tribasischem Natriumcitrat auf menschliche Leukocyten in vitro. Schweiz. med. Wschr. 77, 40 (1947)
2. Allison, A.C.; Sandelin, K.: Activation of lysosomal enzymes in virus-infected cells and its possible relationship to cytopathic effects. J. exp. Med. 117, 879-887 (1963)
3. Allison, A.C.; Mallucci, L.: Histochemical studies of lysosomes and lysosomal enzymes in virus-infected cell cultures. J. exp. Med. 121, 463-476 (1965)
4. Altland, P.D.; Highman, B.; Nelson, B.D.; Garbus, J.: Effects of dimethyl sulfoxide on serum enzymes and tissues in exercised rats. Life Sci. 5, 375-383 (1966)
5. Andersen, V.; Koch, C.; Vejlsgaard, R.; Wilken-Jensen, K.: Fatal granulomatous disease. Acta paediat., Uppsala 57, 110 (1968)
6. Archer, G.T.: Phagocytosis by human monocytes of red cell coated with Rh antibodies. Vox. Sang., 10, 590-598 (1965)
7. Barthelmai, W.; Vetrella, M.; Eschenbach, C.; Jehn, E.: Leukocytenisolierung aus kleinen Blutvolumina. Klin. Wschr. 49, 263-268 (1971)
8. Bonnin, J.A.; Schwartz, L.: The combined study of agglutination, hemolysis and erythrophagocytosis. Blood 9, 773 (1954)

9. Cohn, Z.A.; Hirsch, J.G.: The influence of phagocytosis on the intracellular distribution of granule-associated components of polymorphonuclear leukocytes.
J.exp.Med. 112, 1015 (1960)
10. Conway, H.: The production of erythrophagocytosis in peripheral blood.
J.clin.Path. 6, 208 (1953)
11. Dannenberg, A.M.; Walter, P.C.; Kapval, F.A.:
A histochemical study of phagocytic and enzymatic functions of rabbit mononuclear and polymorphonuclear exudate cells and alveolar macrophages.
II. The effect of particle ingestion on enzyme activity; two phases of in-vitro activation.
J.Immunology 90, 448-465 (1963)
12. Douglas, S.D.; Davis, W.C.; Fudenberg, H.H.:
Granulocytopathies: Pleomorphism of neutrophil dysfunction.
Amer.J.Med. 46, 901-909 (1969)
13. Ehrlich, P.: Über paroxysmale Hämoglobinurie.
Dtsch.med.Wschr. 7, 224 (1881)
14. Eschenbach, C.: Zur Ätiologie der Progessiven Septischen Granulomatose.
Pediat.Res. 4, 493-499 (1970)
15. Eschenbach, C.: Cytochemischer Nachweis von saurer Desoxyribonuclease im Cytoplasma von Blutzellen.
II. Aktivität der sauren Desoxyribonuclease im Cytoplasma von Leukocyten während akuter Infektionen.
Klin.Wschr. 49, 949-957 (1971)

16. Eschenbach, C.; Seebach, G.: Anomalie der Lysosomenmembran von neutrophilen Granulocyten als Ursache der Progressiven Septischen Granulomatose.
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 7, 16-26 (1971)
17. Flanagan, J. F.: Hydrolytic enzymes in KB cells infected with poliovirus herpes simplex virus.
J. Bact. 91, 789-797 (1966)
18. Gander, E. S.; Moppert, J. M.: Der Einfluß von Dimethylsulfoxid auf die Permeabilität der Lysosomenmembran bei quantitativer und qualitativer Darstellung der sauren Phosphatase.
Histochemie 20, 211 (1969)
19. Gerhards, E.; Gibian, H.: The metabolism of dimethyl sulfoxide and its metabolic effects in man and animals.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 141, 65-76 (1967)
20. Gerhards, E.; Gibian, H.: Stoffwechsel und Wirkung des Dimethylsulfoxid.
Naturwissenschaften 55, 435-438 (1968)
21. Gerling-Petersen, B. T.; Pondman, K. W.:
Erythrophagocytosis: A study of the antigen-antibody-complement reaction.
Vox. Sang. 7, 655-674 (1962)
22. Ghajar, B. M.; Harmon, S. A.: The effect of dimethyl sulfoxide on permeability of staphylococcus aureus.
Biochem. biophys. Res. Commun. 32, 940-944 (1968)

23. Good, R.A.; Quie, P.G.; Windhorst, D.B.; Page, A.R.;
Rodey, G.E.; White, J.; Wolfson, J.J.; Holmes, B.H.:
Fatal granulomatous disease of childhood: A hereditary defect of leukocyte function.
Sem.hematol.5, 215-254 (1968)
24. Greendyke, R.M.; Brierty, R.E.: In vitro studies on
erythrophagocytosis.
Blood 22, 295-312 (1963)
25. Hamaguchi, K.: Structure of muramidase.
VIII. Effect of dimethyl sulfoxide on the
stability of muramidase.
J.Biochem.56, 441-449 (1964)
26. Hawiger, J.; Horn, R.G.; Koenig, M.G.; Collins, R.D.:
Activation and release of lysosomal enzymes by
isolated leukocytic granules by liposomes.
A proposed model for degranulation in polymorphonuclear leukocytes.
The Yale J.of Biol.and Med.42, 57-70 (1969)
27. Heise, E.R.; Myrwik, Q.N.; Leake, E.S.: Effect of
bacillus Calmette-Guérin on the levels of acid
phosphatase, lysozyme and cathepsin in rabbit
alveolar macrophages.
J.Immunol. 95, 125-130 (1965)
28. Hirsch, J.G.; Bernheimer, A.W.; Weissmann, G.: Motion
picture study of the toxic action of streptolysins on leukocytes.
J.exp.Med. 118, 223-228 (1963)
29. Hitzig, W.H.; Molz, G.; Plüss, H.J.; Renner, R.:
Progressive septische Granulomatose.
Helv.Paediat.Acta 24, 246 (1969)

30. Holmes, B.; Quie, P.G.; Windhorst, D.B.; Good, R.A.:
Fatal granulomatous disease of childhood.
Lancet I, 1225-1228 (1966)
31. Huber, H.; Fudenberg, H.H.: Die Phagocytose von
Erythrocyten-Antikörper-Komplexen in vitro.
Blut, XIX, 357-364 (1969)
32. Jordan, Jr., W.S.; Prouty, R.L.; Heinle, R.W.; Dingle, J.H.
The mechanism of hemolysis in paroxysmal cold
hemoglobinuria. III. Erythrophagocytosis and
leukopenia.
Blood 7, 387 (1952)
33. Kaplan, E.L.; Laxdal, T.; Quie, P.G.: Studies of
Polymorphonuclear leukocytes from patients
with chronic granulomatous disease of child-
hood: bactericidal capacity for streptococci.
Pediatrics 41, 591 (1968)
34. Karnovsky, M.L.: Metabolic basis of phagocytic
activity.
Physiol. Rev. 42, 143 (1962)
35. Kauder, E.; Kahle, L.L.; Moreno, H.; Partin, J.C.:
Leukocyte degranulation and vacuol formation
in patients with chronic granulomatous disease
of childhood.
J. clin. Invest. 47, 1753-1762 (1968)
36. Malucci, L. Allison, A.C.: Lysosomal enzymes in cells
infected with cytopathic and noncytopathic
viruses.
J. exp. Med. 121, 477-485 (1965)

37. Mandell, G.L.; Hook, E.W.: Leukocyte function in chronic granulomatous disease of childhood.
Amer.J.Med. 47, 473-486 (1969)
38. Miller, M.E.; Seals, J.; Kaye, R.; Levitsky, L.C.:
A familial plasma-associated defect of phagocytosis. A new cause of recurrent bacterial infections.
Lancet 2, 60 (1968)
39. Misch, D.W.; Misch, M.S.: Dimethyl sulfoxide :
Activation of lysosomes in vitro.
Proc.nat.Acad.Sci.(Wash.) 58, 2462-2467 (1967)
40. Pearlman, D.S.; Ward, A.P.; Becker, E.L.: The requirement of serine esterase function in complement-dependent erythrophagocytosis.
J.exp.Med. 130, 745-764 (1969)
41. Quie, P.G.; White, J.G.; Holmes, B.; Good, R.A.:
In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: Diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood.
J.clin.Invest. 46, 668-679 (1967)
42. Rabinowitch, M.: The role of antibodies in the ingestion of aldehyde-treated erythrocytes attached to makrophages.
J.Immunology 99, 232-237 (1967)
43. Schubothe, H.; Gross, F.: Studien zur Erythrophagocytose.
Schweiz.med.Wschr. 38/39, 952-953 (1955)

44. Sbarra, A.J.; Karnovsky, M.L.: The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes.
J. Biol. Chem. 234, 1355 (1959)
45. Saito, K.; Suter, E.: Lysosomal acid hydrolases in mice infected with BCG.
J. exp. Med. 121, 727-737 (1965)
46. Sommer, S.; Tauberger, G.: Toxigologic investigations of dimethyl sulfoxide.
Arzneimittelforschung. 14, 1050 (1964)
47. Suter, E.; Hullinger, L.: Nonspecific and specific cellular reactions to infections.
Ann. New York Acad. Sc., 88, 1237 (1960)
48. Thacore, H.; Wolff, D.A.: Activation of isolated lysosomes by poliovirus-infected cell extracts.
Nature (London) 218, 1063-1064 (1968)
49. Thompson, E.N.; Chandra, R.K.; Cope, W.A.; Soothill, J.F.: Leukocyte abnormality in both parents of a patient with chronic granulomatous disease.
Lancet 8, 799 (1969)
50. Thorbecke, G.J.; Old, L.J.; Benacerraf, B.; Clarke, D.A.: Histochemical study of acid and alkaline phosphatase in mouse liver during various conditions modifying activity of reticuloendothelial system.
J. Histochem. Cytochem. 9, 392 (1961)
51. Weissmann, G.: Lysosomes.
Blood 24, 594-606 (1964)

52. Weissmann,G.: Labilisation and stabilisation of lysosomes.
Fed.Proc. 23,1038-1044 (1964)
53. Weissmann,G.;Keiser,H.;Bernheimer,A.W.:
The effects of streptolysins O and S on the release of acid hydrolases from a granular fraction of rabbit liver.
J.exp.Med. 118,205-222 (1963)
54. Weissmann,G.;Becker,B.;Thomas,L.: Studies on lysosomes. V. The effects of steptolysins and other hemolytic agents on isolated leukocyte granules.
J.Cell.Biol. 22,115-126 (1964)
55. Wolff,D.A.;Bubel,H.C.: The disposition of lysosomal enzymes as related to specific viral cytopathic effects.
Virology 24,502-505 (1964)
56. Zinkham,W.H.;Diamond,L.K.: In vitro erythrophagocytosis in acquired hemolytic anemia.
Blood 7,592 (1952)

Lebenslauf

Am 11. März 1944 wurde ich als Sohn des Dr. Walter Seebach und seiner Ehefrau Grete, geb. Siebert, in Diez an der Lahn geboren.

Im Jahre 1945 zogen wir nach Kassel, wo ich von 1950 bis 1954 die Volksschule besuchte. Von 1954 an besuchte ich in Kassel die jetzige Albert-Schweitzer-Schule, an der ich im Februar 1963 mein Abitur ablegte.

Nach der Immatrikulation an der Philipps-Universität zu Marburg begann ich im Sommersemester 1963 mit dem Studium der Medizin. Nach bestandenem Vorphysikum (23.4.1964) und Physikum (28.10.1965) legte ich das medizinische Staatsexamen am 19.12.1968 in Marburg ab.

Während meiner Medizinalassistentenzeit war ich in der Medizinischen Universitäts-Klinik Marburg (1.2.69 - 30.11.69), der Universitäts-Kinderklinik Marburg (1.12.69 - 31.3.70) und der Chirurgischen Klinik der Universität Marburg (1.4.70 - 31.7.70) tätig. Im Anschluß an die Medizinalassistentenzeit begann ich mit der Facharzt-ausbildung an der Universitäts-Kinderklinik Marburg.

Seit dem 1.4.1971 bin ich als wehrpflichtiger Arzt bei der Bundeswehr in Marburg tätig.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten in Marburg:

Beckmann, Berendes, Bommer, Braun-Falco, Brück, Buchholz, Dimroth, Dittrich, Dölle, Drawert, Exner, Gedigh, Golenhofen, Grebe, Hensel, Heuser, Hildebrandt, Hohorst, Jacob, Karlson, Knauff, Lang, Linneweh, Löhr, Lübbers, Mann, Mahr, Martini, Marx, Mattes, d. Mesnil d. Rochment, Neubauer, Oehmig, Petry, Pots, Rohen, Rodeck, Salfeld, Schleyer, Schlosser, Schmid, Schwaiger, Seidel, Siegert, Siess, Straub, Streichner, Strohmeyer, Walcher, Wendt, Würterle, Zilliken.

